



Universidad  
Católica de  
Valencia  
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN  
VETERINARIA

# Evaluación del efecto ansiolítico de la melatonina mediante test *Open Field* en ovino de carne.

Alumna: Marina Romero Isarria  
Tutor: Carlos Mínguez Balaguer  
2020-2021



Facultad de Veterinaria  
y Ciencias Experimentales  
Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, en especial a mis padres. Porque a pesar de las veces que fallara, no habéis dejado de confiar en mí, siendo un apoyo incondicional. No olvidéis nunca que sois mi motor.

A mi pareja, Fran. Porque hasta en mis momentos más flojos me has hecho ver que era capaz de lograrlo. Gracias por transmitirme tu positividad y seguridad. Gracias también por darme el empujón cuando lo he necesitado y por acompañarme en todo momento.

A la gran familia que me ha dado esta etapa académica, a mis pilares dentro de la universidad. Esas personas con las que he compartido tantas horas de estudio, prácticas, penas, llantos y, por supuesto, muchas alegrías. A vosotras, Mara, Nerea, Blanca, Paula, Martyna y Enea.

A Marta, Lorena, Vanessa y Aitana, por ser mi oasis en la tormenta y por vuestra continua confianza en mí.

A mi tutor, Carlos, por ser tan paciente y dedicarle todas las horas que fuese necesario. Esas tardes intensivas de trabajo, estrés y alguna que otra pelea con R, han dado su fruto.

También me gustaría agradecer a todas las personas que formaron parte de esta investigación. Gracias por hacer que esas tardes calurosas de verano fueran muy especiales y se transformaran en el presente trabajo.



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1. Evolución del sector ganadero hacia la intensificación .....	5
2.2. Preocupación de los ciudadanos y los consumidores por el bienestar animal .....	5
2.3. Normativa de bienestar animal y “Cinco libertades” .....	7
2.4. ¿Qué es el bienestar animal? .....	9
2.5. El estrés .....	12
2.6. Principales estresores en ganadería .....	13
2.7. El estrés en ovino de carne .....	15
2.8. Test <i>Open Field</i> .....	17
2.9. Utilización de la melatonina en ganadería .....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1. Animales y diseño experimental .....	21
4.2. Análisis estadístico .....	24
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>41</b>
ANEXO I.....	41



## 1. RESUMEN

En los últimos 50 años el sector ganadero ha experimentado notables cambios hacia la intensificación para hacer frente a la creciente demanda. En sincronía con estos cambios, ha ido evolucionando la preocupación de los consumidores y ciudadanos por el bienestar animal. El estrés es uno de los principales Indicadores de Bienestar. En este afán de mejorar el bienestar de los animales de producción, en el presente trabajo se estudió el efecto ansiolítico de la melatonina en ovino de carne. Para ello, se utilizó una población de 30 ovejas, divididas en tres grupos de forma aleatoria: Grupo Diazepam, Grupo Melatonina y Grupo Control. Se evaluó el grado de estrés mediante test Open Field. En él, se sometió a los animales a aislamiento y a un nuevo espacio, donde se midieron diferentes parámetros comportamentales representativos de estrés para poder analizar las diferencias significativas entre grupos y, por tanto, si la melatonina tiene efecto ansiolítico. Los resultados evidenciaron que dicha sustancia no presentó efectos calmantes, al no observar diferencia significativa entre el Grupo Melatonina, Grupo Diazepam y Grupo Control. De cara a futuras investigaciones, se propone combinar variables comportamentales con fisiológicas y aumentar el tamaño de muestra para poder obtener resultados más concluyentes.

**Palabras clave:** Bienestar animal, diazepam, estrés, melatonina, ovino de carne, test *Open Field*.





**ABSTRACT**

In the last 50 years, the livestock sector has experienced noticeable changes towards intensification to face the growing demand. Contemporaneously with these changes, consumers and citizens' concern about animal welfare has been evolving. Stress is one of the main Welfare Indicators. In this eagerness to improve livestock's welfare, in the present work, the anxiolytic effect of melatonin on meat sheep was studied. For that purpose, a 30 sheep population was used, divided into three groups randomly: Diazepam Group, Melatonin Group and Control Group. Stress was evaluated with an Open Field test. In that test, animals were subjected to isolation and a new space, where different behavioural parameters representative of stress were measured in order to analyze significant differences between the groups, and thus, whether melatonin has an anxiolytic effect. Results revealed that this substance did not present calming effects, as no significant difference between the Melatonin Group, Diazepam Group and Control Group was observed. For forthcoming research, it is proposed to combine behavioural variables with physiological ones as well as to increase the sample size for obtaining more conclusive results.

**Keywords:** Animal welfare, diazepam, meat sheep, melatonin, stress, test Open Field.



## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Evolución del sector ganadero hacia la intensificación**

En los últimos 50 años el sector ganadero ha experimentado notables cambios para hacer frente a la creciente demanda de alimentos de origen animal como consecuencia del rápido crecimiento de las economías del mundo (Buller, Blokhuis, Jensen y Keeling, 2018). En este periodo, se observó un incremento de la población mundial, multiplicando su número por 2,4. Como consecuencia, el consumo de carne también se vio aumentado en un 4,7 (Fernandes, et al., 2019). Esto hizo inevitable un cambio hacia una mayor eficiencia (Charles, Godfray y Garnett, 2014) y un proceso hacia la intensificación de los sistemas productivos en ganadería (Buller et al., 2018). En la actualidad, la ganadería sigue evolucionando hacia sistemas más productivos ya que se calcula que se debe hacer frente a un aumento del consumo mundial de carne de 72 kg por cabeza/año previsto para el 2050 (Miele, 2016).

Durante este camino y reestructuración del sector ganadero hacia la intensificación se han producido cambios, no solo en el aumento del número de animales por granja y acortamiento de los ciclos productivos; sino también en innovaciones tecnológicas y mecanización. De esta forma, la producción fue dirigiéndose, en un principio, a una rentabilidad basada en la mayor cantidad de producto, descuidando otros aspectos como la calidad nutricional, organoléptica, sostenibilidad medioambiental e incluso sanitaria. Esta situación derivó en crisis sanitarias y alimentarias (Encefalopatía Espongiforme Bovina, Peste Porcina Africana, Salmonelosis, etc.) que provocaron gran preocupación en los consumidores y causó en ellos un pensamiento más crítico en lo relacionado con la producción animal (Cespedes, Hernandez y Romero, 2002).

### **2.2. Preocupación de los ciudadanos y los consumidores por el bienestar animal**

Una vez garantizado el abastecimiento mediante la intensificación de la ganadería, la mirada crítica de los consumidores derivó en otros muchos aspectos que también se ven involucrados en las actividades productivas. Así pues, las actividades agrícolas ya no se consideran simplemente un medio de producción de alimentos, sino que son fundamentales para otros objetivos sociales claves como la inocuidad, la calidad de los alimentos, salvaguardar la protección del medio ambiente, la sostenibilidad y el bienestar de los animales (Blokhuis, Keeling, Gavinelli, Serratosa, 2008).

En lo referente al bienestar animal, se observó que, en las últimas dos décadas, un número cada vez mayor de consumidores y ciudadanos exigían sistemas de producción más éticos y afirmaron su negativa a adquirir productos que no satisficieran sus preocupaciones sobre el bienestar animal. En Europa, tras comparar los resultados de las encuestas de 2006 y 2015

(European-Commission, 2007; European-Commission, 2016), reveló una preocupación creciente en cuanto al bienestar animal. En dichas encuestas se observó que el nivel de importancia que asignaron a la protección del bienestar de los animales de granja fue de 7,8/10 -(en promedio)- en el caso de los encuestados del 2006. Sin embargo, este porcentaje aumentó del 34% al 57% entre 2006 y 2015 (European-comission, 2016).

Para comprender esta situación, se debe entender los diferentes roles que juegan los ciudadanos y los consumidores en relación con las implicaciones morales del bienestar de los animales de granja y su influencia sobre la integridad de los sistemas intensivos. En primer lugar, los ciudadanos participan en el proceso de formación de la opinión pública impulsando la legislación (Grunert, 2006). Los gobiernos deben reflejar las preocupaciones públicas por el bienestar animal de granja. En segundo lugar, se encuentran los consumidores. Estos influyen de forma directa en el mercado, ya que su preocupación por el bienestar de los animales de granja puede dificultar la compra de ciertos productos y, como es de esperar, esto influye en la sostenibilidad de los sistemas intensivos. Además, las preocupaciones de los consumidores no se distribuyen por igual entre las diferentes especies agrícolas, ni existe coherencia en la disposición a pagar ese incremento sobre el producto final que supone la mejora del bienestar animal en la producción (Clark, Frewer, Kyrizakis, Panzone, Stewart, 2016). En Europa, solo una minoría (3%) está dispuesta a pagar precios superiores al 20% del valor de un producto, y el 35% no está dispuesta a pagar ningún aumento derivado del incremento en el coste que supone las mejoras en el bienestar animal (European-comission, 2016). A esta situación hay que añadir el concepto que los consumidores tienen sobre un producto “respetuoso con los animales”, ya que lo asocian con alimentos saludables, de mayor calidad, sabrosos, higiénicos, más seguros, ecológicos y tradicionales (Bijttebier et al., 2016; Mason, McEachern, Schröder, Whitelock, Willock, 2007; Cardoso, Hötzel, Robbins, Von Keyserlingk, Weary, 2016). Por tanto y observando la evolución de los últimos años, se puede concluir que el bienestar animal se ha establecido como uno de los criterios utilizados para decidir si un sistema es sostenible y si la calidad del producto es buena (Broom, 2011).

### **2.3. Normativa de bienestar animal y “Cinco libertades”**

Estos cambios y preocupaciones también se ven reflejados en la normativa, que ha ido modificándose en sincronía con los cambios sucedidos. La normativa existente sobre bienestar de los animales productores afecta a todas las fases de la producción: la propia producción, el transporte y el sacrificio. Esta normativa se elabora desde diversos ámbitos: la Organización Mundial de Sanidad Animal, el Consejo de Europa, la Unión Europea y España. Dentro de España, existe tanto normativa de aplicación en todo el territorio, como la de obligado cumplimiento en el territorio de la Comunidad Autónoma que lo promulga.

La Unión Europea, es uno de los líderes mundiales en bienestar animal, sumando más de 40 años de trabajo para mejorar la calidad de vida de los animales. Tanto es así, que las reglas europeas tienen un impacto positivo en la legislación de terceros países. Protegen sobre todo a los animales de producción, pero también son de aplicación en los salvajes, los animales de laboratorio y las mascotas. Las primeras normas europeas sobre protección animal se tomaron en los años 70, pero fue en 1998 cuando entró en vigor la directiva relativa a la protección de los animales en explotaciones ganaderas (Directiva 98/58/CE, 1998). Esta directiva establece criterios generales para proteger a todos los animales (incluidos peces, reptiles y anfibios) criados o mantenidos para la producción de alimentos, lana, cuero, pieles u otros fines ganaderos. Esta se basa en la Convención Europea para la Protección de Animales en explotaciones ganaderas firmada en 1978 y reflejan las llamadas “Cinco Libertades”. Estos fundamentos surgieron como respuesta a la inquietud de muchos británicos acerca de las condiciones de explotación de los animales destinados a uso y consumo humano. Fue en los años 60 cuando Roger Brambell formuló las “Cinco libertades” que establecen aquellas condiciones que garantizan que un animal esté en situación de bienestar (Brambell, 1965). Así pues, un animal tiene bienestar cuando:

- 1) Está libre de hambre, sed y desnutrición
- 2) Está libre de miedos y angustia
- 3) Está libre de incomodidades físicas o térmicas
- 4) Está libre de dolor, lesiones o enfermedades;
- 5) Está libre para poder expresar las conductas y pautas de comportamiento propias de la especie.

De lo anterior se deduce que no solo se tiene que conocer las necesidades relativas a alimentación y salud, sino que también se les debe permitir manifestarse como la especie que son.

Estas “Cinco libertades” fueron perfeccionadas en 1979 por el Farm Animal Welfare Council (FAWC) de Reino Unido y se han utilizado internacionalmente como marco conceptual para describir los principios fundamentales del bienestar animal (Chapman y Vapnek, 2011).

En este espacio legal también tiene cabida el Consejo de Europa que, mediante la elaboración de Convenios, Acuerdos y Recomendaciones, sirven de referencia en todo el continente y constituyen la base para la modificación y armonización de las legislaciones. España entró a formar parte del Consejo de Europa en 1977. Actualmente hay cinco convenios básicos referentes al bienestar animal (Convenio para la Protección de los animales en el Transporte Internacional, 1968; Convenio para la Protección de animales en las Explotaciones Ganaderas, 1976; Convenio para la protección de los Animales al Sacrificio, 1979; Convenio para la Protección de los Animales de Experimentación, 1986).

En cuanto a la normativa de carácter nacional cabe destacar la Ley 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. El objetivo de dicha Ley es establecer normas básicas para el cuidado de los animales en la explotación, durante su transporte y en el momento del sacrificio. También se incluyen normas básicas referentes a los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Para garantizar el cumplimiento de la normativa se realizan inspecciones. Las administraciones públicas, en el ámbito de sus competencias, son las encargadas de realizar controles para asegurar su cumplimiento. Así mismo, las Comunidades Autónomas, correspondiendo a la Administración General del Estado, realizan aquellas inspecciones relativas a la protección animal en materia de importación, exportación de animales y en los centros que dependen de ella.

También se contempla, en casos graves donde se ponga en riesgo la vida de los animales, la posibilidad de adoptar medidas provisionales de carácter cautelar.

Además, se tipifican las distintas clases de infracciones en función de varios criterios. Por un lado, dependiendo del riesgo o daño que una actividad tenga para los animales. Por otro, dependiendo del grado de intencionalidad. Habrá sanciones económicas que van de 600 a 100.000 euros.

Asimismo, se modifica la Ley 8/2003, de sanidad animal, de forma que las explotaciones de animales de nueva creación tienen que haber sido inspeccionadas por la autoridad competente para comprobar el cumplimiento de los requisitos exigibles en materia de protección animal antes de autorizar su puesta en marcha.

Hoy en día, se considera delito el maltrato de los animales domésticos, debido a la modificación de la Ley Orgánica 10/1995 por la actual, Ley Orgánica 15/2003. Asimismo, se introduce como falta el abandono de animales

En España, la normativa general básica en materia de bienestar de los animales en las granjas viene establecida en el Real Decreto 348/2000 del 10 de marzo. Se trata de la transposición al ordenamiento jurídico español de la Directiva 98/58/CE, que incluye los principios de provisión de estabulación, comida, agua y cuidados adecuados para cubrir sus necesidades fisiológicas y etológicas, de acuerdo a la experiencia adquirida y los conocimientos científicos. También se incluyen aquellos requisitos que deben de cumplir aquellos que figuren como responsables de los animales. Este Real Decreto es aplicable a las granjas de cualquier animal, es decir, se incluye también a los peces, reptiles y anfibios, criado o mantenido para la producción de alimentos, lana, cuero, pieles o con otros fines agrícolas.

Adicionalmente a esta legislación general, existen otras normas que establecen las características específicas de las condiciones de cría de algunas especies ganaderas. Concretamente las que afectan al vacuno (terneros menores de 6 meses) (Real Decreto 1047/1994), al porcino (Real Decreto 1135/2002), a las gallinas ponedoras (Real Decreto 3/2002) y a los pollos criados para la producción de carne (Real Decreto 692/2010).

#### **2.4. ¿Qué es el bienestar animal?**

Se han generado una gran variedad de definiciones en las últimas cinco décadas sobre el bienestar animal. Dichas definiciones varían en función de la importancia que se le diera a cada uno de los siguientes factores: los aspectos de la capacidad del animal para hacer frente al medio ambiente (Broom, 1986; Fraser y Broom, 1990), la calidad de la vida experimentada y evaluada por el animal (Sumner, 1996) y los estados mentales positivos y negativos (Dawkins, 1988).

Fraser (2003) clasificó los enfoques científicos para definir el bienestar animal en tres grupos según se centraran en el funcionamiento biológico del animal (objetivo); las emociones experimentadas por los animales o estados afectivos (subjetivos); y, finalmente, si el comportamiento o el entorno en el que vive el animal es similar al estado natural de la especie (vida natural).

A pesar de las discrepancias, hay puntos en común. Así pues, se coincide en la idea de que el bienestar es una característica inherente del animal y no del medio ambiente (Vanhonacker y Verbeke, 2014). También en la idea de que el bienestar no es algo estático, sino que varía continuamente a lo largo del tiempo en una escala que va de “muy malo” a “muy bueno”, requiriendo el uso de diferentes medidas científicas para evaluarlo (Bracke, Spruijt y Metz, 1999).

Hughes (1976) entendía que se alcanzaba el bienestar animal cuando dicho animal estaba en armonía con la naturaleza o con su entorno. Esta definición impide la medición científica, pero incluye un pilar fundamental que, con posterioridad, Broom utiliza para explicar el concepto de bienestar animal, definiéndolo de la siguiente manera: “el bienestar animal es el estado de un animal cuando trata de ajustarse al ambiente que le rodea” (Broom, 1986; Broom Y Fraser, 2007). Esta definición implica, por tanto, que el bienestar es un estado del animal, no algo que se le proporciona. Un individuo que se enfrenta a las condiciones en las que vive puede hacerlo muy fácilmente, utilizando sus diversos sistemas reguladores, o puede que tenga que dedicar mucho tiempo y energía al hacerlo. Así pues, un “mal bienestar” podemos encontrarlo en aquellos individuos que no se adaptan al ambiente o si tienen dificultad para ello. Por tanto, el bienestar está relacionado con todos aquellos mecanismos para enfrentarlo: involucrando la fisiología, el comportamiento, los sentimientos y las respuestas patológicas (Broom, 2011).

Volviendo nuevamente al concepto de bienestar animal y como se ha comentado anteriormente, dicho concepto ha evolucionado a lo largo de los últimos años en la sociedad. Anteriormente, el bienestar aplicado a los animales era equivalente al concepto de salud física. Si un animal no estaba enfermo o herido, gozaba de bienestar. Por tanto, el reconocimiento de su estado recaía en la parte clínica y su control estaba guiado por criterios de higiene y productividad. Sin embargo, en las últimas décadas del siglo pasado, debido a los grandes cambios económicos, sociales y culturales, ha habido un cambio en el tipo de relación que el hombre tiene con la naturaleza y los animales. El concepto de bienestar animal que se maneja en la actualidad es más amplio, engloba no solamente la salud física sino un estado de bienestar general que, como se ha citado anteriormente, requiere que el organismo esté en un equilibrio con su medio (Broom, 1986).



Para poder evaluar dicho bienestar se deberá recurrir a la comunidad científica. Se plantean tres objetivos para poder medirlo. En primer lugar, establecer un diagnóstico sobre el estado de salud física y mental en que se encuentran los animales en contacto con el hombre, para lo cual se han propuesto varios indicadores conocidos como “Medidas de Bienestar Animal”. En segundo lugar, para diseñar unas instalaciones que permitan unas condiciones óptimas de mantenimiento y manejo, se debe conocer los requerimientos necesarios del medio que haga compatible su bienestar con la finalidad práctica de su uso o explotación. Y, en tercer lugar, establecer criterios objetivos que nos permitan conocer las situaciones en las que los animales pueden sufrir o aquellas en las que no se garantice el bienestar. En este punto cabe destacar que, para algunos investigadores, no solo se alcanza un bienestar cuando los animales “están bien” (sanos) sino que además deben “sentirse bien”. Es decir, para evaluar el bienestar animal debemos preguntarnos no solo cómo están, sino cómo se sienten (Bateson, 1991; Dawkins, 2003).

Por todo lo comentado hasta el momento, la evaluación del bienestar animal pasará en primer lugar por evaluar la salud física y determinar si el animal “está bien”; para continuar con la determinación de si el animal “se siente bien”. Con respecto a la salud física, las enfermedades, heridas, daños físicos y otro tipo de signos de mala salud son los primeros y más obvios indicadores de malestar debido a que:

- a) Indican que el individuo tiene una mayor probabilidad de morir
- b) Denotan que los mecanismos de defensa se han activado y estos pueden ser fuente de experiencias mentales displacenteras. Es decir, manifiesta que el animal no solamente está mal sino que, además, se puede sentir mal (tener experiencias mentales desagradables, como dolor, malestar, agotamiento o miedo).

Para conocer si el animal “se siente bien” son de utilidad las Medidas de Bienestar Animal. Sin embargo, hay que tener cuidado a la hora de interpretarlas, ya que son indicadores que se deben entender en un sentido inverso, de tal forma que es la ausencia de los mismos lo que manifiesta que los animales están bien. Alguno de estos indicadores son el estrés, el dolor, el miedo o la fiebre que tienen un “diseño displacentero” debido a que temporalmente reducen el bienestar, pero son adaptaciones evolutivas que ayudan a los organismos a contrarrestar una amenaza para su salud y eficacia biológica que permitirán prevenir su salud y reproducción a largo plazo (Fisher y Lee, 2017). Otros indicadores de bienestar son los comportamientos “anormales”, que indican que los animales han fracasado en su intento de hacer frente a las amenazas (Dawkins, 1998).

## 2.5. El estrés

El estrés es una de los Indicadores de Bienestar que más se evalúa para determinar el bienestar animal. Esto es así debido a que se trata de una respuesta fisiológica de naturaleza estereotipada e inespecífica que está asociada a múltiples factores amenazantes o dañinos del medio. Todo ello deriva a que se dé mucha importancia a sus síntomas, sobre todo al nivel plasmático de los glucocorticoides (cortisol y corticosterona, conocidas como hormonas del estrés). Se entiende que el estrés es “un conjunto de cambios fisiológicos y neurofisiológicos debidos a diferentes estímulos internos y externos llamados estresores” según define Selye (1976). Estos cambios se producen de manera secuencial y con distintas repercusiones sobre el organismo, en un proceso denominado Síndrome General de Adaptación (General Adaptation Syndromo: GAS) (Fink, 2000).

La primera fase del GAS es la denominada reacción de emergencia o reacción adrenal. Se produce una respuesta inmediata causada por un peligro inminente, por lo que el organismo se prepara para una acción rápida. Fisiológicamente se genera por la activación del Sistema Simpático y la consiguiente liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) desde la médula adrenal. Todo ello desencadenará un aumento del ritmo respiratorio y circulatorio, una liberación de eritrocitos desde el bazo y un mayor flujo sanguíneo hacia el músculo esquelético, aumentando el suministro de oxígeno a estos tejidos. La segunda fase o estado de resistencia, se da si la fuente de peligro o daño no desaparece de forma inmediata. Se produce entonces la activación del Sistema Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA), aumentando la producción de la hormona Adeno-corticotropa (ACTH), con la consiguiente liberación de glucocorticoides y mineralcorticoides. Todos estos cambios permiten mantener elevados los niveles de energía libre en forma de glucosa.

Si los factores estresantes se mantienen, se entra en la tercera fase: fase de agotamiento o estrés crónico. En este punto los mecanismos reguladores y adaptativos empiezan a fallar y se entra en un estado pre-patológico. Aunque la actividad de la glándula adrenal continúa, la tiroides y otras glándulas decae, la eficacia del sistema inmunológico disminuye, se producen cambios degenerativos en distintos órganos corporales (aparición de úlceras gástricas, por ejemplo) y disminuye la eficacia biológica del individuo (disminuyendo su tasa de crecimiento, produciéndose retrasos en la reproducción o incluso cese de la actividad sexual, disminución de la producción de gametos y aumento en el número de abortos) (Concha, 2003).

En síntesis, los estímulos se pueden dividir en varios grupos en función de su naturaleza, duración e intensidad. Según duración de la respuesta generada, se clasifican en agudos cuando la duración de los mismos es limitada o crónicos cuando su duración es prolongada (Nowak, Porter, Blache y Dwyer, 2008). Sin embargo, un estresor agudo puede llegar a ser crónico cuando se presenta de forma repetida o cuando su intensidad es anormalmente alta (Fink, 2000).

## **2.6. Principales estresores en ganadería**

Los estresores pueden ser físicos (daño, sobreexigencia, excesivo calor o frío y ruidos) o psicológicos (eventos inesperados, frustración, aislamiento, separación maternal y hechos traumáticos) (Odeón y Romera, 2017). Cada uno de estos sucesos producirá diferentes respuestas, tanto conductuales como fisiológicas (Franco-Villanueva, Herman, Myers, y Scheimann, 2016). Sin embargo, actualmente hay evidencias suficientes que sugieren que las consecuencias negativas de estos estresores no dependen de la naturaleza física de dicho estímulo, sino más bien de la medida en que el animal puede preverlo y controlarlo. Por consiguiente, se ha sugerido que el término “estrés” debería utilizarse en el caso de que la situación exceda la capacidad de regulación del organismo, especialmente cuando dicha situación implica un cierto grado de imprevisibilidad y falta de control (McEwen, 2005).

Por tanto, para garantizar el bienestar animal, es necesario conocer los factores que generan estrés en el ganado. En animales de producción pueden ser divididos en: factores físicos, sociales (resultantes de las interacciones entre individuos de la misma especie) y prácticas derivadas del manejo. Son multifactoriales y ello los hace difíciles de cuantificar, tipificar y, por tanto, controlar.

Los principales factores capaces de afectar al ganado son (Odeón y Romera, 2017):

- a) Todos los derivados de causas ambientales (cambios de temperatura, humedad relativa, lluvias prolongadas, sequías, inundaciones, vientos fuertes, etc.);
- b) Derivados del régimen de vida, entre lo que se incluye instalaciones inadecuadas o precarias, comederos y bebederos insuficientes o con una capacidad inapropiada, ambiente poco higiénico, oscuros, ventilación (tanto si es excesiva como si es insuficiente) o hacinamiento;
- c) Nutrición inadecuada tanto en cantidad (provocando sensación de hambre o sed) como en calidad (dieta mal balanceada, pasturas secas, agua salobre o alimentos inadecuados para esa especie en concreto);

- d) Debido a enfermedades, ya sean víricas, bacterianas, micóticas, parasitarias o intoxicaciones;
- e) Factores quirúrgicos y psíquicos: heridas, quemaduras, fracturas, postquirúrgicos, así como castigos, gritos, uso de pica eléctrica y otras malas praxis.

Cabe destacar que estos factores estresantes tienen efecto aditivo. Es decir, cuando varios de ellos inciden al mismo tiempo, la respuesta de estrés resultante será mayor que si el animal fuese expuesto a un solo factor.

Todos estos estresores tienen efectos sobre la producción ganadera. El estrés, además de perturbar el bienestar, afecta negativamente a la rentabilidad y viabilidad económica de las explotaciones. Entre estos efectos negativos incluyen (Temple, Mainau y Manteca, 2013):

- 1) Cambios en la función inmune (con la consiguiente mayor susceptibilidad a padecer enfermedades)
- 2) La disminución de la ingesta de alimento y de la rumia, repercutiendo en la producción, la inhibición de la liberación de oxitocina y la reducción de la fertilidad, entre otros.

En síntesis, de lo anterior se deduce que las repercusiones del estrés impactan sobre la productividad, la reproducción y la salud.

Los Glucocorticoides (GC), la hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH) y la leptina ejercen un efecto inhibitor sobre el apetito, repercutiendo así en la alimentación de los animales. Asimismo, produce un efecto inhibitor sobre la rumia, lo cual reducirá la digestibilidad de los alimentos y consecuentemente el rendimiento productivo, aumentando también el riesgo de acidosis ruminal. El mecanismo preciso de este efecto no se conoce aún; sin embargo, está demostrado que cuando el animal sufre estrés por calor, el mantenimiento de la temperatura corporal normal empieza a alterar su tasa metabólica basal. Todo ello deriva, entre otras cosas, en ganancias de peso significativamente menores, carne más dura, y más cortes lindantes con carne oscura (Voisinet, Grandin, Tatum, O'Connor y Struthers, 1997; Blokhuis, Keeling, Gavinelli y Serratosa, 2008).

Evolutivamente, la inhibición de la reproducción en situaciones estresantes parece tener ventajas que le evitan al animal riesgos en épocas de alta demanda metabólica. La activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) como respuesta al estrés afecta de modo significativo al funcionamiento reproductivo. Prácticas como el transporte, el aislamiento y la inmovilización activan dicho eje y pueden inhibir la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina desde el hipotálamo, de la hormona luteinizante desde la hipófisis y la producción de estradiol folicular (Odeón y Romera, 2017).

### **2.7. El estrés en ovino de carne**

En el caso concreto del ovino de carne, algunas de las situaciones que generan más estrés durante su vida productiva son:

- a) El destete (tanto para las reproductoras como para las crías)
- b) El transporte
- c) El esquileo
- d) El manejo sanitario o el proceso de identificación individual.

Adicionalmente, estas situaciones de estrés pueden verse incrementadas si se produce una mala praxis. Por lo anteriormente expuesto, es lógico pensar que cualquier método/tratamiento que pueda reducir el estrés en ovejas o corderos de la granja incrementará tanto el bienestar como la producción (gestaciones a término y óptimo crecimiento de los corderos). Además, si el animal no sufre estrés se facilitará el manejo.

Probablemente uno de los factores más críticos y estresantes es el destete. Los ovinos se caracterizan por presentar un vínculo madre-cría altamente selectivo, el cual se establece inmediatamente después del parto (Poindron, Levy y Keller, 2006). La intensidad del vínculo cambia a lo largo del periodo de lactación. Es menor cuanto más se aproxima la hora del destete debido a que hay una progresiva independencia del cordero (Weary, Jasper y Hötzel, 2008). En situaciones de destete artificial temprano, el estrés es mayor que en la crianza natural ya que se caracteriza por el reemplazo completo del amamantamiento, realizándose una cría artificial con leche o la sustitución de la leche por alimentos sólidos (Brown, 1964; Napolitano, Rosa y Sevi, 2008; Weary, Jasper y Hötzel, 2008).

Este manejo implica varios cambios críticos, como son (Brown, 1964):

- a) La separación de la oveja y su cordero
- b) Cambios nutricionales para el cordero
- c) Cambios del ambiente físico (comúnmente los corderos y las ovejas son llevados a parques diferentes)
- d) Sociales (un ambiente que estaba formado por ovejas y corderos, será formado por solamente corderos u ovejas).

La edad del destete artificial varía según el objetivo productivo, siendo realizado tempranamente (0-2 días) en los sistemas ovinos de producción de leche (Napolitano et al., 2008), y entre los 60 y 150 días en los sistemas dirigidos a la producción de carne.

En ovinos se ha estudiado la respuesta productiva y los efectos negativos producidos por diferentes tipos de destete, ya sea: abrupto, progresivo, en etapas o alambrado de por medio (colocación de ovejas y corderos separados por una valla durante varios días, antes de separarlos definitivamente) (Orgeur et al., 1998; Orgeur et al., 1999; Schichowski, Moors y Gauly, 2008; Freitas-de-Melo, Banchero, Hötzel, Damián y Ungerfeld, 2013). Los resultados de los trabajos anteriormente citados evidencian que el destete abrupto (uno de los más utilizados) y el destete progresivo con valla, son los que generan mayores respuestas de estrés al destete.

Para garantizar el bienestar animal, actualmente los productores disponen de varias herramientas, como son: guías de buenas prácticas de bienestar animal, manejo sanitario y preventivo contra enfermedades, evaluación de la capacidad reproductiva y manejo eficiente de la alimentación. Muchos países y consumidores imponen exigencias reglamentarias y/o legales que determinen estándares de bienestar con los que se deben manejar los animales. Los productos deben cumplir estas exigencias para poder comercializar sus derivados, brindar una mejor vida al animal y aumentar la calidad del producto.

## 2.8. Test *Open Field*

Como demuestra la bibliografía, el estrés impide directamente la consecución del bienestar animal. Es por ello que es imprescindible cuantificarlo. Uno de los test comportamentales que se pueden usar en esta materia es el Test *Open Field*. Fue desarrollada por Hall y Ballachey (1932), y estaba inicialmente destinada a estimar la actividad locomotora y la voluntad de explorar en roedores. Consiste en separar a un individuo de sus compañeros e introducirlo en un espacio nuevo y previamente diseñado (generalmente es un recinto cuadrado, rectangular o circular con paredes circundantes que evitan el escape) y medir el comportamiento tras la entrada libre a este espacio o bien forzada (Gould, Dao, y Kovacsics, 2009). La simplicidad de la configuración de la prueba y la medición fácil y rápida de los comportamientos ha hecho que el test *Open Field* sea popular para medir la actividad y la exploración en una variedad de animales más allá de los roedores (Perals, Griffin, Bartomeus y Sol, 2017). También se ha usado otro tipo de animales, incluyendo especies ganaderas como bovino (Kilgour, 1975; De Pasillé, Rushen y Martin, 1995), ovejas (Le Neindre, Poindron, Trillat, y Orgeur, 1993) y cerdos (Beilharz y Cox, 1967).

Como se ha comentado, inicialmente esta prueba se desarrolló para medir características desconocidas y mal definidas, como "miedo" o "emocionalidad" (Hall y Ballachey, 1932). Se colocó un solo animal en una gran área nueva y se interpretó que la cantidad de defecación y actividad reflejaba la respuesta a la novedad. Trabajos posteriores han demostrado que las respuestas son complejas, implican una combinación de exploración, congelación en respuesta al miedo, intentos de escape y respuestas al aislamiento social (Archer, 1973). Además, también pueden reflejar factores no emocionales como la capacidad aeróbica (Friedman, Garland, y Dohm, 1992) y capacidad de aprendizaje (Lamberty y Gower, 1993).

Por tanto, la principal finalidad del test *Open Field*, es evaluar el miedo o "angustia" de los animales.

En el test *Open Field* se somete a los animales a aislamiento y a un nuevo espacio, donde se miden diferentes parámetros como son: vocalizaciones, defecación, orina, desplazamientos, intentos de escape y paradas.

El test *Open Field* es útil en ovino conociendo su carácter gregario. Así pues, la eliminación de sus conespecíficos familiares induce respuestas conductuales y de estrés endocrino (Guesdon et al., 2012). De cara al estudio del efecto ansiolítico de ciertas sustancias, estas características y el test *Open Field* sirven de herramientas para conocer el efecto sobre el estrés de dichas sustancias en ovejas.

## 2.9. Utilización de la melatonina en ganadería

La melatonina es sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal durante la noche. Su ritmo de secreción endógena está bajo el control del núcleo supraquiasmático y arrastra el ritmo diurno de las conductas (Claustrat, Brun y Chazot, 2005; Pevet y Challet, 2011). Concretamente, la glándula pineal es responsable de traducir la información neuronal proveniente del ciclo de luz-oscuridad en una señal hormonal. Sus concentraciones varían de acuerdo al ritmo circadiano de la luz o ciclo diurno-nocturno (altas en la noche y bajas en el día) (Lincoln y Maeda, 1992; B. Malpaux et al., 1996).

Una de las sustancias que se usa en la producción de ovino es la melatonina. Generalmente se usa para el control reproductivo, principalmente para desestacionalizar. Ha sido ampliamente estudiada principalmente con respecto a los ritmos estacionales y la reproducción (Malpaux et al., 1996). Sin embargo, es conocido su efecto ansiolítico en roedores. Algunos estudios muestran que la melatonina ejerce un efecto ansiolítico en roedores (Golombek et al., 1993) y, que disminuye los efectos endocrinos neuronales y somáticos de los factores estresantes después de la administración tanto aguda como crónica (Otsuka et al., 2002; Tugyan et al., 2006; Detanico et al., 2009). Además, se observó que la melatonina atenúa la respuesta adrenocortical al estrés e influye a la biosíntesis, liberación y respuesta a glucocorticoides (Konakchieva, Mitev, Almeida y Patchev, 1997).

Más allá de la sincronización de los ritmos estacionales y circadianos y del control del sueño (Bittman, Dempsey y Karsch 1983; Malpaux et al., 1996), esta hormona parece afectar a los procesos emocionales en múltiples niveles debido a que la secreción de melatonina está bajo el control de experiencias estresantes. La melatonina tiene impacto en las respuestas al estrés conductual, endocrino y neurobiológico, a menudo junto con la fase del día. Se demostró que la melatonina disminuye los comportamientos similares a la ansiedad durante la noche (Golombek, Martini y Cardinali, 1993) y mejora varias consecuencias negativas de la exposición al estrés crónico (Konakchieva et al., 1997; Detanico et al., 2009). Estos efectos no están tan estudiados en el caso del ovino, aunque existen evidencias por las cuales la melatonina disminuye el impacto endocrino y conductual del aislamiento social en las ovejas (Guesdon et al., 2012).

Por tanto, sería importante respaldar la hipótesis de que la melatonina ejerce un efecto calmante en situaciones socialmente estresantes mediante un test objetivo como el *Open Field*.



### **3. OBJETIVOS**

Como se ha descrito en la introducción, la melatonina tiene efecto ansiolítico en diferentes animales, sin embargo, las referencias son escasas en el ámbito del ovino.

Por tanto, el objetivo del trabajo es comprobar si la melatonina (aplicada en implantes de liberación prolongada) ejerce un efecto ansiolítico en el ovino de carne, evaluando factores de estrés mediante Test *Open Field*.



#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos realizados en este experimento han sido aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Católica de Valencia (código de referencia CEEAUCV2012).

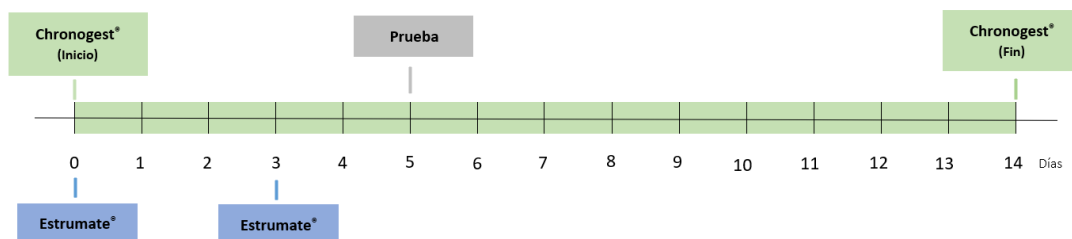
##### 4.1. Animales y diseño experimental

La investigación se realizó en julio de 2020 e incluyó a un total de 30 ovejas. Las ovejas fueron criadas en la granja de la Universidad Católica de Valencia “San Vicente Mártir” (REGA: ES461650000003) bajo las mismas condiciones de manejo, alojamiento y nutrición.

Para formar parte de la población de estudio, los animales debían cumplir los siguientes criterios: encontrarse en óptimo estado de salud (para ello se realizó una exploración física general), con edad comprendida entre 1 y 6 años, presentar una condición corporal entre 2.5 y 3.5 (Thompson y Meyer, 1994) y encontrarse en el mismo estado fisiológico (vacías) verificado mediante ecografía (Ecógrafo modelo IMAGO, Humeco, Huesca, España).

La población se dividió en tres grupos experimentales, estando comprendido cada uno de ellos por 10 individuos seleccionados de forma aleatoria. El primer grupo, Grupo Control (GC), estuvo formado por aquellas ovejas a las que no se les administró ningún tratamiento. El segundo grupo, Grupo Melatonina (GM) está compuesto por las ovejas a las que se le administró melatonina de liberación prolongada en inyección subcutánea (Melovine® 18 mg, Barcelona, España) en la base de la oreja cinco días antes del inicio de la prueba. El tercer grupo es el Grupo Diazepam (GD). A estos se les administró 0,1 mg/kg de diazepam el día del experimento, por su conocido efecto ansiolítico (Gray 1987; Sandem, Hanczak, Salte y Braastad, 2006).

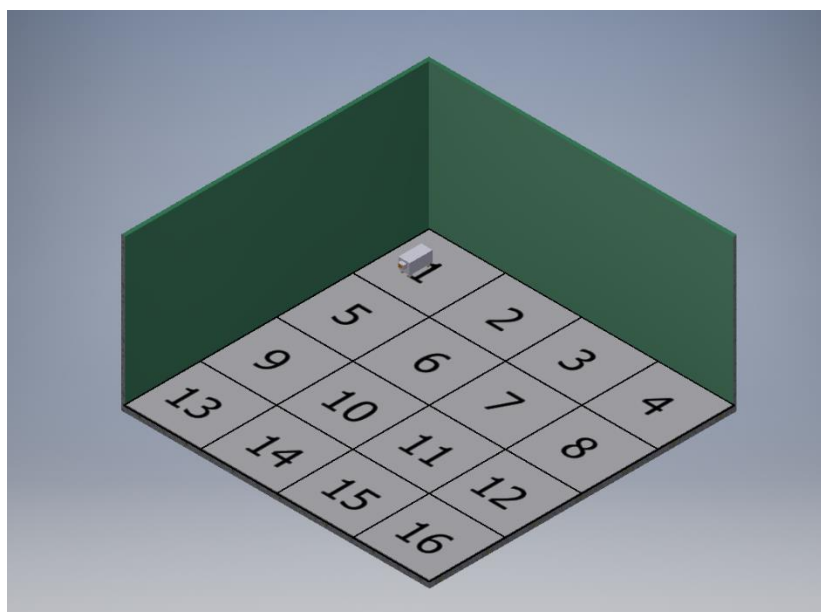
En la Figura 1, se muestra el protocolo de sincronización seguido en el experimento. Dicho protocolo consistió en colocar a los animales un dispositivo de progesterona intravaginal (Chronogest® 20 mg, Intervet, Igoville, Francia) 5 días antes de comenzar la evaluación. El dispositivo se mantuvo un total de 14 días. Se aplicó también dos dosis de 50 microgramos de un análogo de PGF2 $\alpha$  (Estrumate®, Alcantarilla, Murcia, España), una al mismo momento de la colocación de la esponja y la segunda 2 días antes de comenzar el test. Esta sincronización sirve tanto para situarlas en el mismo estado fisiológico como para evitar variaciones en las concentraciones de estrógenos y progesterona (Pérez, Garese, Fleischmann, Ganzábal y González, 2012).



**Figura 1.** Protocolo sincronización. La escala numérica corresponde a los días. Chronogest®: Implante intravaginal de progesterona (dosis de 20 mg); Estrumate®: prostaglandina F2 $\alpha$  inyectable intramuscular (IM) (dosis de 50  $\mu$ g); Prueba: día en el que se realiza el test *Open Field*. En este estudio se realizó un protocolo de sincronización combinando progesterona con prostaglandina. Se introduce el dispositivo intravaginal (Chronogest®) 5 días antes del estudio y se mantiene hasta completar 14 días. La prostaglandina (Estrumate®) se administra en 2 dosis: el día 0, coincidiendo con el implante de progesterona, y el día 3, 2 días antes de la prueba.

Para comprobar si la melatonina tenía efecto ansiolítico, se sometió a las ovejas a un estrés puntual y se evaluaron diferentes parámetros para medir su ansiedad. Es por ello que se opta por el test comportamental *Open Field*.

El recinto *Open Field* estuvo compuesto por paredes opacas de 2 metros de altura y un área de 16m<sup>2</sup>, dividido en cuadrantes, siendo cada uno de estos de una dimensión de 1m x 1m. Dichos cuadrantes se numeraron para facilitar el posterior estudio de las variables analizadas (Figura 2). Varias imágenes reales del recinto se pueden observar en el Anexo I.



**Figura 2.** Representación 3D de la estructura del recinto *Open Field* elaborado en Autodesk Inventor.

El proceso experimental se realizó durante 4 días consecutivos. Para evitar efecto de tiempo de espera y día de estudio, se fueron intercalando cada día ovejas de los distintos grupos experimentales de forma aleatoria.

Treinta minutos antes de la introducción de las ovejas en el recinto, se les administró el tratamiento que correspondiera a su grupo de estudio. A las ovejas del GD, se les administró 0,1 mg/kg de diazepam por vía intravenosa; a las del GC y GM se les inyectó 0,1 mg/kg de suero fisiológico con el objetivo de realizar el mismo manejo con todos los grupos de tratamiento, debido a que la inyección puede generar estrés (Cook et al., 2000). En el caso del GM, se le administró la misma mediante inyección subcutánea (Melovine® 18 mg) en la base de la oreja 5 días antes del inicio de la prueba, ya que se trataba de implantes de liberación prolongada.

Las ovejas fueron conducidas por sus propios medios a través de una manga de manejo al *Open Field* y permanecieron en él durante un tiempo de 5 minutos. Durante este periodo, fueron grabadas para poder interpretar todos los datos con posterioridad. En el test se registraron las siguientes variables numéricas de comportamiento:

- a) Número de olfateos
- b) Número de veces que permanecen paradas
- c) Número de intentos de escape
- d) Número de vocalizaciones (balidos)
- e) Número de eliminaciones (defecaciones)
- f) Número de desplazamientos. Midiendo el número de líneas divisorias cruzadas.

Una vez terminado este periodo de grabación, el animal fue sometido a otro estudio (*Novel Object*) durante otros 5 minutos que consistía en la introducción de un objeto extraño en el recinto del *Open Field*. Transcurridos los 10 minutos desde su introducción, la oveja fue devuelta al corral, a través de la misma manga por la que entró.

Antes de la entrada del siguiente animal, se limpió el suelo con hipoclorito sódico diluido para eliminar el olor del animal testado con anterioridad.

#### 4.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado en el programa *R Project* (R Core Team, 2020). En el estudio, se evaluaron las variables número de balidos, escapes, olfateos, paradas y líneas cruzadas para cada uno de los diferentes grupos experimentales.

En primer lugar, los datos fueron sometidos a un test Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1972) para conocer si cada una de las diferentes variables seguían una distribución normal. Cada una de estas variables fue estudiada por separado y analizada mediante test Kruskal-Wallis (variables no normales) o test Anova (variables que siguen una distribución normal), siendo el valor de significación de  $\alpha=0,05$ . En aquellas en las que hubiera diferencias significativas, se realizó una prueba de Wilcoxon o una prueba Tukey, respectivamente.

## 5. RESULTADOS

La primera variable estudiada, número de olfateos, seguía una distribución normal (*p-value* en el test Shapiro = 0,721). Se realizó un test Anova, evidenciando que no había diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para la misma variable (*p-value*= 0,747).

Para el número de paradas se realizó un test Kruskal Wallis, ya que los datos no se distribuyeron de forma normal (*p-value* en test Shapiro=  $1,997e^{-05}$ ). Los resultados, fueron los mismos que en el caso anterior, no hay diferencia entre los distintos tratamientos (*p-value* en test Kruskal Wallis=0,7228).

La variable número de escapes tampoco siguió una distribución normal (*p-value* en test Shapiro=  $6,063e^{-07}$ ). De la misma forma, no se apreciaron diferencias entre diazepam, melatonina y control (*p-value* en test Kuskal Wallis= 0,643).

En cuanto a las defecaciones, los datos no siguieron una distribución normal (*p-value* del test Shapiro= 0,000607). No se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos de tratamiento (*p-value* de test Kruskal Wallis= 0,987).

En cuanto al número de desplazamientos, los datos sí que siguieron una distribución normal (*p-value* en Shapiro test= 0,8607) por lo que se trataron con un test Anova. Se reveló que no existían diferencias significativas entre diazepam, melatonina y control (*p-value* en Anova= 0,247).

En contraste con los resultados anteriores, para la variable número de balidos se observaron diferencias significativas entre el diazepam con el resto de grupos (resultados para Willcow: *p-value* GD-GC= 0,032; *p-value* GD-GM= 0,017). Entre los grupos melatonina y control no se observaron diferencias significativas (*p-value*= 0,16).

En síntesis y a la vista de los resultados, se puede concluir que la melatonina no presenta efecto ansiolítico al no obtener diferencias significativas entre melatonina con respecto a control.





## 6. DISCUSIÓN

Como se puede observar en el anterior apartado, los resultados estadísticos revelaron que, salvo para la variable “número de balidos”, no hay diferencia significativa entre los distintos grupos de tratamiento. Con tales resultados, se asume que ni melatonina ni diazepam presentan efecto calmante o ansiolítico en este estudio.

El diazepam está agrupado dentro de las benzodiazepinas (Calcaterra y Barrow, 2014). Actúa potenciando o facilitando la acción inhibitoria del neurotransmisor ácido gamma aminobutírico (GABA). GABA es un mediador químico que provoca inhibición tanto a nivel presináptico como postsináptico en todas las regiones del sistema nervioso central, produciendo efectos sedativos y ansiolíticos (Calcaterra y Barrow, 2014). Era de esperar, por tanto, que los resultados del análisis estadístico fueran significativos con el GD. Al no obtener dichas evidencias sería de interés analizar si el test *Open Field* combinado con diazepam es una buena forma de evaluar el estrés. Prut y Belzung (2002) evaluaron los efectos de diferentes fármacos sobre variables similares a la ansiedad en el test *Open Field*. En el caso de las benzodiazepinas no se revelaron los efectos intrínsecos de tales compuestos. Tanto es así, que en el 31% de los estudios realizados en ratones y ratas no se apreció efecto ansiolítico o incluso en el 13% se presentan efectos ansiogénicos (Prut y Belzung, 2002) cuando se evalúa con test *Open Field*. Sin embargo, para una de las variables de nuestro estudio (número de balidos), sí se apreciaron diferencias significativas del GD frente al GM y GC. Cabe considerar que probablemente “número de balidos” sea una variable más específica para determinar estrés, con respecto a las demás. Para el resto de parámetros estadísticos se estudiaron las tendencias, revelando que las ovejas tratadas con diazepam tenían un número de escapes menor al resto. Es probable que, con un tamaño de muestra superior, se hubieran encontrado diferencias significativas en alguna de las variables estudiadas.

Otra de las variables que sería de interés incluir en este test por su especificidad es la relativa a los cuadrantes centrales del test *Open Field*. Prut y Belzung (2002) mostraron que un aumento de la locomoción en las áreas centrales o del tiempo de permanencia en la zona central del recinto *Open Field* sin modificación de la locomoción total se puede interpretar como un efecto ansiolítico mientras que lo contrario, es decir, una disminución de estas variables se asocia con ansiedad. Es por ello que, incluir esta variable en el estudio podría ser de interés y más específica.

Las respuestas a un evento estresante incluyen cambios comportamentales, cambios en el sistema inmunológico y activación del sistema neuroendocrino (eje hipotalámico-pituitario-adrenal), así como el sistema nervioso autónomo (Moberg, 2000). Con ello se entiende, que como la activación de las respuestas al estrés dependen del contexto, la medición de un solo parámetro puede ser engañoso (Broom y Johnson, 1993; Moberg, 2000).

Una de las posibilidades para lograr una evaluación integral del estrés, es el uso de biomarcadores (McEwen, 2013). Se denomina biomarcador a una sustancia, estructura o proceso capaz de ser medido y evaluado como indicador de un estado biológico normal o patológico (Strimbu y Tavel, 2010). Cannon (1932) fue el primero que consideró las hormonas como biomarcadores. Entre los marcadores que podemos encontrar son: aquellos que corresponden al eje simpático adrenomedular (SAM) con catecolaminas, al eje hipotalámico-hipofisario-adrenal caracterizado por la liberación de cortisol (Piazza, Almeida, Dmitrieva y Klein, 2010) e, incluso, a la activación del sistema inmune (Sternber, 2006). Uno de los biomarcadores más ampliamente utilizados en este tipo de estudios es el cortisol. Este glucocorticoide ha sido asociado consistentemente en la literatura consultada al estrés (Khoury et al., 2015). Tradicionalmente se ha estudiado el cortisol plasmático pero, sin embargo, su uso es controvertido debido a que el acto de recoger la muestra puede estresar al animal (Cook et al., 2000). Alternativamente, se encuentran disponibles otras matrices de muestra como saliva, leche, excrementos (orina y heces), pelo/plumas o huevos para poder medir el cortisol (Möstl, Maggs, Schrötter, Besenfelder y Palme, 2002; Schmidt, Kaltwasser y Wotjak, 2013). Incluir este tipo de evaluaciones en nuestro estudio sería de interés para poder comprobar si los resultados obtenidos en el *Open Field* son adecuados para medir el estrés. Cuando enfrentamos los resultados del test con el de los biomarcadores, podemos concluir si las variables del test *Open Field* son representativas de estrés.

En cuanto a la melatonina, pese que hay estudios que muestran el efecto ansiolítico en mamíferos como roedores o ratas (Guesdon et al., 2013), en nuestro estudio no se ha demostrado para el caso del ovino de carne.

En síntesis, para futuras investigaciones, sería interesante medir tanto variables comportamentales (test *Open Field* con variables más específicas como tiempo de permanencia en cuadrantes centrales) como fisiológicas (medición de cortisol en saliva o lana) para poder determinar si la melatonina tiene efectos ansiolíticos.

## 7. CONCLUSIÓN

Se concluye que la Melatonina, en este estudio, no ejerce un efecto ansiolítico en ovino de carne cuando es evaluada con test *Open Field*. Sería necesario evaluar otros parámetros que no fuesen solo los comportamentales para poder llegar a un resultado más concluyente.

Se propone, para nuevos estudios, escoger otras variables más representativas (como tiempo de permanencia en cuadrantes centrales) en el test *Open Field*, así como medir otros parámetros fisiológicos (cortisol) y aumentar el número de muestra.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behaviour*, 21(2), 205-235.
- Bateson, P. (1991). Assessment of pain in animals. *Animal Behaviour*, 42 (5), 827-839.
- Beilharz, R. G. y Cox, D. F. (1967). Genetic Analysis of Open Field Behavior in Swine. *Journal of Animal Science*, 26 (5), 988-990.
- Bijttebier, J.; De Graaf, S.; Lauwers, L.; Tuytens, F.; Van Loo, E.; Vanhonacker, F. y Verbeke, T. (2016). Determinants of consumer intention to purchase animal-friendly milk. *Journal of Dairy Science*, 99 (10), 8304-8313.
- Bittman, E.L.; Dempsey, R. y Karsch, F. J. (1983). Pineal Melatonin Secretion Drives the Reproductive Response to Daylength in the Ewe. *Endocrinology*, 113 (6), 2276-2283.
- Blokhuys, H; Gavinelli, A; Keeling, L. y Serratos, J. (2008). Animal welfare's impact on the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, 19 (1), 79-87.
- Bracke, M.; Spruijt, B. y Metz, J. (1999). Overall animal welfare assessment reviewed. Part 1: Is it possible?. *Neth. J. Agr. Sci.*, 47 (3-4), 279-291.
- Brambell, Committee. (1965). Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. Report Nº: 2836.
- Broom, D. (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, 142 (6), 524-526.
- Broom, D. (2011). Bienestar animal: conceptos, métodos de estudio e indicadores. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24 (3), 306-321.
- Broom, D. M y Johnson, K. G. (1993). *Stress and Animal Welfare*. Londres: Chapman & Hall.
- Brown, T. H. (1964). Early weaning of lambs. *The Journal of Agricultural Science*, 63 (2), 191-204.
- Buller, H.; Blokhuys, H.; Jensen, P. y Keeling, L. (2018). Towards Farm Animal Welfare and Sustainability. *Animals: an open access journal from MDPI*, 8(6), 81.
- Buller, H; Blokhuys, H.; Jensen, P. y Keeling, L. (2018). Towards Farm Animal Welfare and Sustainability. *Animals: an open access journal from MDPI*, 8(6), 81.
- Calcaterra, E. N. y Barrow, C. J. (2014). Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium). *ACS Chemical Neuroscience*, 5(4), 253-260.

- Cannon, W. (1932). *The Wisdom of the Body*. Nueva York: WW Norton.
- Cardoso, C; Hötzel, M. J.; Robbins, J; Von Keyserlingk, M. y Weary, D. (2016). Imagining the ideal dairy farm. *Journal of Dairy Science*, 99 (2), 1663-1671.
- Céspedes, G.; Hernandez, A. y Romero, S. (2002). Encefalopatía espongiforme bovina o "enfermedad de las vacas locas". *Gaceta Médica de Caracas*, 110(2), 151-165.
- Chapman, M. y Vapnek, J. (2011). *Legislative and regulatory options for animal welfare*. Roma: FAO.
- Charles, H.; Godfray, J. y Garnett, T. (2014). Food security and sustainable intensification. *The Royal Society*, 369 (1639).
- Clark, B.; Frewer, L.; Kyriazakis, I.; Panzone, L. y Stewart, G. (2016). A Systematic Review of Public Attitudes, Perceptions and Behaviours Towards Production Diseases Associated with Farm Animal Welfare. *Journal of Agricultural Environmental Ethics* 29, 455–478.
- Claustrat, B.; Brun, J y Chazot, G. (2005). The basic physiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9 (1), 11-24.
- Convenio para la Protección de los Animales al Sacrificio. (1979). Consejo de Europa. Estrasburgo, 10 de mayo de 1979.
- Convenio para la Protección de los Animales de Experimentación. (1986). Consejo de Europa. Estrasburgo, 18 de marzo 1986.
- Godfray, H. C. J. y Grnett, J. (2014). Food security and sustainable intensification. *The Royal Society*, 369 (1639).
- Convenio para la Protección de los animales en el Transporte Internacional. (1968). Consejo de Europa. Paris, 13 de diciembre de 1968.
- Convenio para la Protección de los animales en Explotaciones Ganaderas. (1976). Consejo de Europa. Estrasburgo, 10 de marzo de 1976.
- Cook, C. J; Mellor, D. J; Harris, P. J; Ingram, J.R y Matthews, L. R. (2000). Hands-on and hands-off measurement of stress. En G.P. Moberg and J.A. Mench (Ed), *The Biology of Animal Stress* (pp 123-146). Nueva York: CABI Publishing.
- Dawkins, M. (1998). Evolution and Animal Welfare. *The Quarterly Review of Biology*, 73 (3), 305-328.

- Dawkins, M. (2003). Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare1. *Zoology*, 106 (4), 383-387.
- Dawkins, M. S. (1988). Behavioural deprivation: A central problem in animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 20 (3-4), 209-225.
- De Passillé, A. M; Rushen, J. y Martin, F. (1995). Interpreting the behaviour of calves in an open-field test: a factor analysis. *Applied Animal Behaviour Science*, 45 (3-4), 201–213.
- Detanico, B.C.; Piato, A. L.; Freitas, J. J.; Lhullier, F. L.; Hidalgo, M. P.; Caumo, W. y Elisabetsky, E. (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European Journal of Pharmacology*, 607 (1-3), 121-125.
- Directiva 98/58/CE, del 20 de julio de 1998, relativa a la protección de los animales en las explotaciones ganaderas. Diario Oficial. 8 de agosto de 1998, núm. 221, pp 23 – 27.
- European-Commission (2007). Attitudes of EU Citizens towards Animal Welfare, Report; Special Eurobarometer 270; Bruselas, Bélgica: European Comission.
- European-Commission (2007). Attitudes of EU Citizens towards Animal Welfare, Report; Special Eurobarometer 270; European Commission: Brussels, Belgium, p. 82.
- European-Commission (2016). Attitudes of EU Citizens towards Animal Welfare, Report; Special Eurobarometer 442; Bruselas, Bélgica: European Commission.
- Fernandes, J., Blache, D., Maloney, SK ; Martin, GB; Venus, B., Walker, FR y Tilbrook, A. (2019). Addressing animal welfare through collaborative stakeholder networks. *Agriculture*, 9 (6), 132.
- Fernandes, J., Blache, D., Maloney, SK.; Martin, GB.; Venus, B., Walker, FR. y Tilbrook, A. (2019). Addressing animal welfare through collaborative stakeholder networks. *Agriculture*, 9 (6), 132.
- Fink G. (2000). *Encyclopedia of stress*. Nueva York: Academic Press.
- Fisher, A. y Lee, C. (2017). *Advance in Sheep Welfafare*. Cambridge: Elsevier.
- Franco-Villanueva, A.; Herman, J.; Myers, B. y Scheimann, J. (2016). Ascending mechanisms of stress integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 74 (10), 366-375.
- Fraser, A. y Broom, D. (1990). *Farm Animal Behaviour and Welfare*; CAB International: Wallingford.

Fraser, A. y Broom, D. (2007). *Domestic Animal Behaviour and Welfare*; CAB International: Wallingford.

Fraser, D. (2003). Assessing animal welfare at the farm and group level: The interplay of science and values. *Animal Welfare*, 12 (4), 433–443.

Freitas-de-Melo, A; Banchero, G; Hötzel, M. J.; Damián, J. P. y Ungerfeld, R. (2013). Progesterone administration reduces the behavioural and physiological responses of ewes to abrupt weaning of lambs. *Animal*, 7 (8), 1367-1373.

Friedman, W. A.; Garland, T. y Dohm, M. (1992). Individual variation in locomotor behavior and maximal oxygen consumption in mice. *Physiology & Behavior*, 52(1), 97-104.

Golombek, D; Martini, M. y Cardinali, D. (1993). Melatonin as an anxiolytic in rats: time dependence and interaction with the central GABAergic system. *European Journal of Pharmacology*, 237 (2-3), 231-236.

Gould, T. D.; Dao, D. T.; y Kovacsics, C. E. (2009). The Open Field Test. *Neuromethods*, 42, 1–20.

Gray, J. A. (1987). *The psychology of fear and stress*. Cambridge: Cambridge University Press.

Grunert, K. (2006). Future trends and consumer lifestyles with regard to meat consumption. *Meat Science*, 74 (1), 149-160.

Guesdon, V.; Ligout, S.; Delagrangé, P.; Spedding, M.; Lévy, F.; Laine, A. y Chaillou, E. (2012). Multiple exposures to familiar conspecific withdrawal is a novel robust stress paradigm in ewes. *Physiology & Behavior*, 105 (2), 203-208.

Hall, C. y Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1–12.

Hughes, B. (1976). Behaviour as index of welfare. Pp. 1005-1018. 5th Eur. Poultry Conf, Malta.

Khoury, J. E., Gonzalez, A., Levitan, R. D., Pruessner, J. C., Chopra, K., Basile, V. S. y Atkinson, L. (2015). Summary cortisol reactivity indicators: Interrelations and meaning. *Neurobiology of Stress*, 2, 34–43.

Kilgour, R. (1975). The open-field test as an assessment of the temperament of dairy cows. *Animal Behaviour*, 23 (3), 617-624.

Konakchieva, R; Mitev, Y; Almeida, O y Patchev, V. (1997). Chronic melatonin treatment and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat: Attenuation of the secretory response to



stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release. *Biology of the cell*, 89 (9), 587-596.

Lamberty, Y. y Gower, A. J. (1993). Spatial processing and emotionality in aged NMRI mice: A multivariate analysis. *Physiology & Behavior*, 54(2), 339-343.

Le Neindre, P.; Poindron, P.; Trillat, G. y Orgeur, P. (1993). Influence of breed on reactivity of sheep to humans. *Genet Sel Evol*, 25, 447-458.

Ley 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 7 de noviembre del 2007, núm. 268, pp. 45914 – 45920.

Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 24 de abril del 2003, núm. 99, pp. 16006 – 16031. Miele, M. (2016). Public attitudes and understanding of animal welfare standards: Could one welfare help. In *Animal welfare for a better world*. In Proceedings of the 4th OIE Global Conference on Animal Welfare, 6-8.

Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 23 de noviembre del 1995, núm. 281, pp. 33987- 34058.

Ley Orgánica 15/2003, de 25 de noviembre, por la que se modifica la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 25 de noviembre del 2003, número 283, pp. 41842 – 41875.

Lincoln, G. A. y Maeda, K. I. (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *Journal of Endocrinology*, 132 (2), 201-215.

Mason, R.; McEachern, M.; Schröder, M; Whitelock, J. y Willock, J. (2007). Exploring ethical brand extensions and consumer buying behaviour: the RSPCA and the “Freedom Food” Brand. *Journal of Product & Brand Management*, 16 (3), 168-177.

Mateos, Concha. (2003). *Bienestar animal, sufrimiento y consciencia*. Universidad de Extremadura: Cáceres.

McEwen, B. (2005). Stressed or stressed out: What is the difference?. *J Psychiatry NeuroSci*, 30 (5), 315-318.

McEwen, B. (2013). The brain on stress: Toward an integrative approach to brain, body and behavior. *Perspectives on Psychological Science*, 8(6), 673–675.

- Miele, M. (Diciembre 6-8, 2016). Public attitudes and understanding of animal welfare standards: Could one welfare help. Animal welfare for a better world. *Guadalajara, Mexico*.
- Moberg, G. P y Mench, J. A. (2000). *Biological response to stress: implications for animal welfare*. Nueva York: CABI Publishing.
- Möstl, E.; Maggs, J. L.; Schrötter, G.; Besenfelder, U. y Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in ruminant feces. *Veterinary Research Communications*, 26, 127-139.
- Napolitano, F; Rosa, D y Sevi, A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 110 (1-2), 58-72
- Nowak, R.; Porter, R.H.; Blache, D. y Dwyer, C. M. (2008). Behaviour and the welfare of the sheep. In: Dwyer C. (Eds.), *The welfare of sheep* (81-134). Edimburgo: Springer Science.
- Odeón, M. y Romera, S. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista Veterinaria*, 28(1), 69-77.
- Orgeur, P.; Bernard, S.; Naciri, M; Nowak, R; Schaal, B y Levy, F. (1999). Psychological consequences of two different weaning methods in sheep. *Reprod Nutr Dev*, 39, 231-244.
- Orgeur, P; Mavric, N; Yvone, P; Bernard, S; Nowak, R; Schaal, B y Levy, F. (1998). Artificial weaning in sheep: consequences on behavioural, hormonal and immuno-pathological indicators of welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 58 (1-2), 87-103.
- Otsuka, M; Kato, K; Murai, I; Asai, S; Iwasaki, A y Arakawa, Y. (2002). Circadian rhythm of melatonin and prostaglandin in modulation of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Wiley*, 30 (2), 82-86.
- Passillé, A.D., Rushen, J., & Martin, F. (1995). Interpreting the behaviour of calves in an open-field test: a factor analysis. *Applied Animal Behaviour Science*, 45, 201-213.
- Perals, D; Griffin, A. S.; Bartomeus, I. y Sol, D. (2017). Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality?. *Animal Behaviour*, 123, 69-79.
- Pérez, R.; Garese, J. A.; Fleischmann, R; Ganzábal, A y González, C. (2012). Sincronización de celos en cabras en estación reproductiva: uso de esponjas de medroxiprogesterona o aplicación de prostaglandina después de cinco días de detección de celos. *Revista Científica*, 12 (3), 245-251.
- Pevet, P. y Challet, E. (2011). Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of Physiology-Paris*, 105 (4-6), 170-182.

Piazza, J. R.; Almeida, D. M., Dmitrieva, N. O. y Klein, L. C. (2010). Frontiers in the use of biomarkers of health in research on stress and aging. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences*, 65B(5), 513–525.

Poindron, P; Levy, F y Keller, M. (2006). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Dev Psychobiol*, 49 (1), 54-70.

Prut, L. y Belzung, C. (2002). The Open Field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463 (1-3), 3-33.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Real Decreto 1047/1994, de 20 de mayo, relativo a las normas mínimas para la protección de terneros. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 20 de mayo del 1994, núm. 161, pp. 21741 – 21743.

Real Decreto 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 31 de octubre del 2002, núm. 278, pp. 40830 – 40833.

Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 11 de enero del 2002, núm. 13, pp- 1660-1663.

Real Decreto 348/2000, de 10 de marzo, por el que se incorpora al ordenamiento jurídico la Directiva 98/58/CE, relativa a la protección de los animales en las explotaciones ganaderas. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 10 de marzo del 2000, núm. 61, pp. 10192 – 10195.

Real Decreto 692/2010, de 20 de mayo, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne y se modifica el Real Decreto 1047/1994, de 20 de mayo, relativo a las normas mínimas para la protección de terneros. . *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 20 de mayo del 2010, núm 135, pp. 47986 – 47995. Hernández F; Alipio A; Céspedes C.; Ghislaine, & Romero, S. (2002). Encefalopatía espongiiforme bovina o "enfermedad de las vacas locas". *Gaceta Médica de Caracas*, 110(2), 151-165.

- Sandem, A. I.; Hanczak, A. M.; Salte, R. y Braastad, B.O. (2006). The use of diazepam as a pharmacological validation of eye white as an indicator of emotional state in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 96(3-4), 177-183.
- Schichowski, C; Moors, E y Gauly, M. (2008). Effects of weaning lambs in two stages or by abrupt separation on their behavior and growth rate. *Journal of Animal Science*, 86 (1), 220-225.
- Schmidt, U., Kaltwasser, S. F. y Wotjak, C. T. (2013). Biomarkers in posttraumatic stress disorder: Overview and implications for future research. *Disease Markers*, 35(1), 43–54.
- Selye, H. (1976). *Stres in health and disease*. Boston: Butterworth
- Shapiro, S. S. y Wilk, M. B. (1972). An analysis of variance test for the exponential distribution (complete samples). *Technometrics*, 14(2), 355-370.
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: A coordinated nons-specific host response to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 6(4), 318–328.
- Strimbu, K. y Tavel, J. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, 5(6), 463–466.
- Sumner, L. (1996). *Welfare, Happiness, and Ethics*; Clarendon Press: Oxford, UK.
- Temple, D; Mainau, E. y Manteca, X. (2013). Estrés en animales de granja: Concepto y efectos sobre la producción. Recuperado de: <https://www.fawec.org/es/documentos-tecnicos-conceptos-generales/16-estres-en-animales-de-granja>
- Thompson, J. y Meyer, H. (1994). Body condition scoring of sheep, [https://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative\\_report\\_or\\_publications/kk91fk644](https://ir.library.oregonstate.edu/concern/administrative_report_or_publications/kk91fk644)
- Tugyan, K.; Uysal, N.; Ozdemir, D.; Sonmez, U.; Peckcetin, C.; Erbil, G. y Sonmez, A. (2006). Protective effect of melatonin against maternal deprivation-induced acute hippocampal damage in infant rats. *Neuroscience Letters*, 398 (1-2), 145-150.
- Vanhonacker, F. y Verbeke, W. (2014). Public and Consumer Policies for Higher Welfare Food Products: Challenges and Opportunities. *J Agric Environ Ethics* 27, 153-171.
- Voisinet, B. D; Grandin, T; Tatum, J. D.; O'Connor S. F. y Struthers, J. J. (1997). Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily weight gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science*, 75 (4), 892-896.

Weary, D. M; Jasper, J y Hötzel, M. J. (2008). Understanding weaning distress. *Applied Animal Behaviour Science*, 110 (1-2), 24-41.



## ANEXOS

### ANEXO I



*Ilustración 1. Oveja número 7 (Grupo Melatonina) realizando el comportamiento "olfateo"*



*Ilustración 2. Oveja número 24 (Grupo Control) realizando comportamiento "balido"*



**Ilustración 3.** Oveja 62 (Grupo Diazepam) realizando comportamiento "escape"